第 28 回健康医科学研究助成論文集
平成 23 年度 *pp*.83～91（2013.3）

加齢に伴う骨格筋量・筋力低下におけるグルコルチコイドシグナルの意義の究明

清 水 宣 明* 田 中 廣 壽*

ROLE OF GLUCOCORTICOID SIGNAL ON SKELETAL MUSCLE ATROPHY

Noriaki Shimizu and Hirotoshi Tanaka

SUMMARY

Background: Skeletal muscle atrophy characterized by reduced muscle mass and strength is often caused by a complexity of multiple factors. Among them, glucocorticoid, an endocrine hormone secreted from adrenal cortex has been shown to be involved in various types of muscle atrophy, including sarcopenia, disuse, and muscle atrophy accompanied with diabetes mellitus and cancer cachexia. Muscle mass of adult organism is thought to be mainly regulated by thickness of individual myofiber and number of myofibers in the muscle. While thickness of myofibers is regulated by a balance between protein anabolism and catabolism in myofibers, number of myofibers is regulated by destruction and regeneration of myofibers. Muscle regeneration is characterized to undergo sequential processes of activation, proliferation, and differentiation of muscle satellite cells into myotubes. Note that aged muscle possesses lower regeneration property than juvenile muscle does, although the underlying mechanism is unclear.

Purpose: Previously, we have analyzed glucocorticoid regulated gene expression which is related to protein metabolism in myofibers and showed that glucocorticoids reduce thickness of myofibers. Here we aimed to obtain a comprehensive understanding of the role of endogenous glucocorticoids in the regulation of skeletal muscle mass, by investigating gene expression related to muscle regeneration process.

Methods: To dissect a role of endogenous glucocorticoid, we made a mouse model of endogenous glucocorticoid secretion deficiency by surgical adrenalectomy. Using this model, we assessed a role of endogenous glucocorticoids in the regulation of gene expression during muscle regeneration process after an artificial muscle injury by cardiotoxin injection into mouse tibialis anterior muscles.

Results: The adrenalectomized animal model showed almost complete lack of basal and fasting induced secretion of corticosterone, a major endogenous glucocorticoid in rodents. We found that cardiotoxin-induced expression of several genes involved in muscle regeneration, i.e., myogenic transcription factors（Pax7, Myf5, MyoD, myogenin, and MRF4）and accelerators of cell cycle progression（CyclinB1, CyclinB2, and E2F1）, were highly dependent on endogenous glucocorticoids.

Conclusion: Our results may indicate that glucocorticoids can exert opposite effects in regulating skeletal muscle mass by targeting on different cell types in skeletal muscle tissue such as muscle satellite cells and myofibers. Glucocorticoids reduce muscle mass via shifting myofiber protein metabolism to catabolic status. On the other hand, glucocorticoids may increase muscle mass via activating muscle satellite cells to contributing muscle regeneration process. Therefore, we suggest here that further analyses aiming to cell type-specific and context-dependent action of gluco-

* 東京大学医科学研究所附属病院アレルギー免疫科 Department of Rheumatology and Allergy, IMSUT Hospital, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan.

corticoids in the skeletal muscle would lead us to unveil complex mechanisms involved in muscle atrophy caused by diverse factors.

Key words: sarcopenia, muscle atrophy, myopathy, steroid therapy, glucocorticoid.

緒　　言

社会の高齢化に伴い、運動器障害によって生活の質（quality of life; QOL）が低下し、更には医学的治療が必要な状態を呈する人口は確実に増加し、その対策は喫緊の医学的・社会的課題である[11]。骨格筋萎縮は、筋量と筋力が減り運動機能を損なう病態の総称であり[21]、便宜的に次の2つに分けることができる。第1に、筋肉を支配する神経の損傷（神経原性）や筋肉自体の疾病を原因とする筋萎縮（筋原性）。第2に、がんや糖尿病などの消耗性疾患に伴う筋萎縮（悪液質）や、運動不足に低栄養などの要因が加わって生じる筋萎縮（廃用性）、加齢に伴うさまざまな原因により進行する筋萎縮（サルコペニア）、グルココルチコイド過剰による筋萎縮（ステロイド筋症）などの、いわば「二次的な」要因による筋萎縮である。後者の「二次的な」筋萎縮は、しばしば同時に複数の要因により引き起こされ、またその進行過程でも同様にこれら複数の要因が同時に作用して病態が悪化する[2]。このタイプの筋萎縮は要因の切り分けが難しく、萎縮メカニズムの解析や治療法の開発が進みにくい。

個体における骨格筋量は、筋線維の数と太さによって制御されている[20]。成熟した個体においては、筋線維内蛋白質の分解と合成のバランスに対応した筋線維の太さの制御が主と考えられている[8]。しかし、特に加齢筋や損傷筋においては、筋衛星細胞の増殖と筋線維への段階的な分化過程を経た筋再生による、筋線維数の維持あるいは回復を介した筋量制御も重要と考えられている[2]。

視床下部－下垂体系の制御を受けて副腎皮質から分泌されるグルココルチコイドは、核内受容体型リガンド依存性転写因子である、グルココルチコイドレセプター（GR）との結合を介して標的遺伝子発現を調節する[6,18]。骨格筋においてグルココルチコイドは蛋白質の同化抑制と異化亢進をもたらし、筋萎縮を引き起こすことが30年以上前に報告された[9]。その後グルココルチコイドによって、蛋白質翻訳のカギ因子であるmTORの活性が抑制され[29]、蛋白質合成が抑制されることが示された[32]。更に近年、筋萎縮における遺伝子発現制御を介したプロセスが明らかとなりつつある[7]。すなわち多くの筋萎縮モデルに共通して発現が変化する遺伝子の包括的解析から、筋萎縮のマスターレギュレーターとしてFoxO転写因子が同定された[22]。FoxOは通常リン酸化された状態で細胞質に局在するが、脱リン酸化に伴って核に移行し転写因子として機能する[4]。蛋白質の異化亢進は骨格筋における2つの主要蛋白質分解系であるユビキチン－プロテアソーム系（atrogin-1, MuRF1）とオートファジー系（LC3, Bnip3）に関連する遺伝子の発現がFoxOを介して誘導されることにより説明できる[16,22,26,34]。

糖尿病、敗血症などに伴う筋萎縮の発症と進行に、内因性グルココルチコイドが密接に関与していることが明らかにされた。例えば、ストレプトゾトシン糖尿病モデルにおいて、GR遺伝子破壊マウスでは筋萎縮がみられなかったと最近報告された[12]。GR拮抗薬RU486がこれらの筋萎縮に有効であることを示す報告も多い[15,24]。したがって、骨格筋におけるグルココルチコイドシグナルの意義を解明することは、複合した筋萎縮の病態解明と治療法開発基盤の構築に大きな意義を有すると考えられる。そこで本研究では、2つの主要な筋量制御メカニズム、すなわち蛋白質の異化と同化のバランス制御および筋再生の両方におけるグルココルチコイドの役割を解明することを目的とした。具体的には、内因性グルココルチコイドの量がこれらの筋量制御メカニズムに関連する遺伝子の誘導発現に与える影響を明らかにし、筋萎縮治療法の開発に反映できうる知見を得ることを目指した。

研 究 方 法

A．実験動物、試薬

動物実験は、東京大学医科学研究所動物実験委員会の承認下で実施した（承認番号：PH11-19）。7週齢雄の C57BL/ 6 JJcl マウス（日本クレア，n＝56）、8 週齢雄の C57BL/10-mdx マウス（実験動物中央研究所，n＝ 7 ）を、9:00～21:00 を明期とする明暗サイクルで飼育した。飼料は飼育繁殖用一般飼料CE- 2 （日本クレア）を自由摂食させた。解剖は 10:00～13:00 に行った。

B．副腎摘除

ペントバルビタールナトリウム（共立製薬）を滅菌生理食塩水（テルモ）にて 10 mg/ml に希釈し、9 週齢雄 C57BL/ 6 JJcl マウス（n＝28）に 50 mg/kg 体重を腹腔内注射により投与、全身麻酔した。体温低下による衰弱を防ぐため、35 ℃のヒーターマット（夏目製作所）上に伏臥位に保定し、70％エタノールとイソジン（明治製菓）で背部皮膚を清拭、消毒した。背部皮膚を第 11 から第 13 胸椎相当部分より尾側 1.5 cm ほど正中線に沿って切開した。両側の腎臓が後腹膜を透して目視できる程度までの範囲にわたり、皮膚と後腹膜の間に滅菌綿棒（白十字）を挿入して癒着を剥離した。マウスを側臥位に保定し直し、背部皮膚をずらして皮膚開口部から腎臓周辺の腹膜が露出する状態になるように、バラッケ開瞼器（夏目製作所）で皮膚開口部を固定した。腎臓の頭側付近の腹膜を 5 mm 程度切開し、外径 3 mm のリングピンセット（夏目製作所）を腹腔内に挿入して腎臓頭側の脂肪組織中にある淡い橙色の副腎がすべてリングの中に入るように強くつまみ 1 分間保持し副腎に続く血流を遮断した。リングピンセット外側に接するように、先曲り虹彩無鉤ピンセット（夏目製作所）で副腎周辺脂肪組織を保持した後、リングピンセットを離し、副腎をグリュンワルド截除鉗子 KA 2 G21（夏目製作所）で切除した。出血がないことを確認後、マウスを反対側の側臥位に保定し、反対側の副腎を同様に切除した。マウスを伏臥位に保定し、外科用弱弯丸針 12 mm（夏目製作所）とブレードシルク 5 - 0 号黒色糸（夏目製作所）にて、背部皮膚を 4 針ないし 6 針縫合した。完全に覚醒して動き回るまでヒーターマット上にて保温した。副腎摘除後のマウスは、ミネラルコルチコイド枯渇を介したナトリウム再吸収の低下によるナトリウム欠乏症を防止する目的で、高塩濃度飼料 CE- 2 +NaCl 8％（日本クレア）を自由摂食させ、また絶食期間中の飲料水には 10 mg/ml NaCl を加えた。偽手術は、後腹膜切開後、リングピンセットで腎臓頭側の脂肪組織を探り副腎を目視した後、閉創した（n＝28）。

C．筋損傷惹起

コブラ由来カルディオトキシン（CTX, Sigma-Aldrich）を分子量 6800 として滅菌生理食塩水で 0.01 mM に溶解した。マウス前脛骨筋付近の体毛をエピラット除毛クリーム（クラシエ）で除去した。体重20 g のマウス片脚当たり 1 nmol の CTX を筋肉注射するために必要な 0.01mM 溶液量を計算した。以下、副腎摘除と同様の麻酔、35℃ 保温下で行った。前脛骨筋の足首側筋腱接合部付近の皮膚を、筋肉が直視できるように 2 mm 程度切開した。CTX 溶液を満たした 29G 注射器（テルモ）を前脛骨筋のおよそ中心を貫く深さ、すなわち体表より 1.5 mm 程度の深さで、筋肉の 2 / 3 程度の長さまで刺入した。マウスの体重に応じた CTX 溶液の 2 / 3 程度を 2 秒間で注入、1 mm 程度引き抜き、残りの 1/ 3 を 1 秒間で注入、10秒間保持した後に針を抜いた（副腎摘除群，偽手術群，それぞれ n＝ 7 ）。対照マウスには、同様に溶媒を筋肉注射した（副腎摘除群，偽手術群，それぞれ n＝ 7 ）。液漏れがないことを確認し、完全に覚醒して動き回るまでヒーターマット上にて保温した。筋肉注射後 7 日間自由摂食下で飼育した。

D．血漿コルチコステロン濃度測定

ヘパリン（持田製薬）で処理した 23G 注射器（テルモ）にて、ペントバルビタール麻酔下のマウス腹部大静脈より採血した全血を、5 分間、4 ℃、10000×g で遠心した上清を血漿として用いた（副腎摘除群，偽手術群，副腎摘除 14 日後に 36 時間絶食群，偽手術 14 日後に 36 時間絶食群，それぞれ n＝ 7 ）。YK240 Corticosterone EIA キット（矢内原研究所）の取扱説明書に従い、iMark マイクロプレートリーダー（バイオラッド）を用いて血

漿コルチコステロン濃度を定量した。

E．肝、骨格筋 mRNA 発現解析

滅菌生理食塩水で保湿したキムワイプ（日本製紙クレシア）を氷上のシャーレ内で保冷し、全採血後のマウスより摘出した肝（D に示す 4 群それぞれ n = 7）、前脛骨筋、腓腹筋（D に示す 4 群それぞれ両脚で n = 14）を保湿、保冷しながら湿重量を測定した。組織は直ちに液体窒素中で凍結させ、−80℃ で保存した。凍結組織は液体窒素で冷却したクライオプレス（マイクロテック・ニチオン）で 0.2 mm 径以下に粉砕した（C に示す 4 群それぞれ n = 7，D に示す 4 群それぞれ n = 5 および C57BL/10-mdx マウス n = 7）。粉砕組織からセパゾール RNA I Super G を用いて全 RNA を抽出し、オリゴ $(dT)_{20}$ プライマー（ライフテクノロジーズ）と SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR（ライフテクノロジーズ）を用いて cDNA を作製した。リアルタイム PCR は、Thunderbird Probe qPCR Mix（東洋紡）、UPL ユニバーサルプローブライブラリーセット、マウス（ロシュアプライドサイエンス）、CFX96 リアルタイム PCR 解析システム（バイオラッド）を用いて行った。それぞれの遺伝子の mRNA 発現量は、段階希釈した cDNA を用いてそれぞれの遺伝子ごとに作製した標準曲線に基づき、検体間の相対量として算出した。PCR に用いたプライマーとプローブの塩基配列を表 1 に示す。

F．統計処理

独立した 2 標本が等分散とみなせない場合の 2 標本 t 検定（ウェルチの t 検定）による両側 P 値が0.01未満のとき有意差があるとした。図中のグラフは標本群の平均値を示し、エラーバーは標本群の不偏標準偏差を示す。

結　　果

A．副腎摘除による内在性グルココルチコイドシグナルの消失

副腎摘除後 14 日間飼育したマウスの血漿コルチコステロン濃度は、平均 36 ng/ml と、偽手術群平均 227 ng/ml の 1/ 6 未満（$P < 0.001$）であった（図 1 A）。また、偽手術 14 日後に 36 時間の絶食を行ったマウスでは、平均 438 ng/ml と、絶食によりおよそ 2 倍の増加（$P < 0.001$）を認めた一方、副腎摘除 14 日後に 36 時間の絶食を行ったマウスでは、平均 40 ng/ml（$P = 0.88$）と、自由摂食群と絶食群の間に統計的有意差のあるコルチコステロン濃度差を認めなかった（図 1 A）。上記マウスの肝臓より RNA を抽出し、肝臓におけ

表 1．リアルタイム PCR による mRNA 発現解析に使用したプライマーとプローブの塩基配列
Table 1. Oligo DNA sequences of primers and probes used in real-time PCR for analyzing mRNA expression.

Gene	Accession number	Forward primer	Reverse primer	Probe
TAT	NM_146214	5’-ggaggaggtcgcttcctatt-3’	5’-gccactcgtcagaatgacatc-3’	5’-ctcctctg-3’
FKBP5	NM_010220	5’-aaacgaaggagcaacggtaa-3’	5’-tcaaatgtccttccaccaca-3’	5’-tggaaggc-3’
GR	NM_008173	5’-tgacgtgtggaagctgtaaagt-3’	5’-catttcttccagcacaaaggt-3’	5’-ggacagca-3’
KLF15	NM_023184	5’-acaggcgagaagcccttt-3’	5’-catctgagcgggaaaacct-3’	5’-ccaggctg-3’
MuRF1	NM_001039048	5’-cctgcagagtgaccaagga-3’	5’-ggcgtagagggtgtcaaact-3’	5’-aggagctg-3’
Bnip3	NM_009760	5’-cctgtcgcagttgggttc-3’	5’-gaagtgcagttctacccaggag-3’	5’-gggaggag-3’
Pax7	NM_011039	5’-ggcacagaggaccaagctc-3’	5’-gcacgccggttactgaac-3’	5’-tccaggtc-3’
Myf5	NM_008656	5’-ctgctctgagcccaccag-3’	5’-gacagggctgttacattcagg-3’	5’-ccacctcc-3’
MyoD	NM_010866	5’-agcactacagtggcgactca-3’	5’-ggccgctgtaatccatcat-3’	5’-catccagc-3’
myogenin	NM_031189	5’-ccttgctcagctccctca-3’	5’-tgggagttgcattcactgg-3’	5’-aggaggag-3’
MRF4	NM_008657	5’-gggcctcgtgataactgct-3’	5’-aagaaaggcgctgaagactg-3’	5’-ggaaggag-3’
CyclinB1	NM_172301	5’-gcgctgaaaattcttgacaac-3’	5’-ttcttagccaggtgctgcat-3’	5’-ctgcttcc-3’
CyclinB2	NM_007630	5’-caaccgtaccaagttcatcg-3’	5’-gagggatcgtgctgatcttc-3’	5’-gcagcaga-3’
E2F1	NM_007891	5’-tgccaagaagtccaagaatca-3’	5’-cttcaagccgcttaccaatc-3’	5’-cagccaca-3’
Myostatin	NM_010834	5’-tggccatgatcttgctgtaa-3’	5’-ccttgacttctaaaaagggattca-3’	5’-caggagaa-3’
atrogin-1	NM_026346	5’-agtgaggaccggctactgtg-3’	5’-gatcaaacgcttgcgaatct-3’	5’-ctctgcca-3’
LC3	NM_025735	5’-catgagcgagttggtcaaga-3’	5’-ccatgctgtgctggttga-3’	5’-cttcctgc-3’

る GR 標的遺伝子であるチロシンアミノトランスフェラーゼ（TAT）[14] および FK506結合蛋白質 5（FKBP5）[33] の mRNA 発現量を定量 RT-PCR により解析した。これら mRNA は、偽手術群では絶食による発現上昇を認める一方で、副腎摘除群では絶食で発現上昇を示さなかった（図 1 B）。前
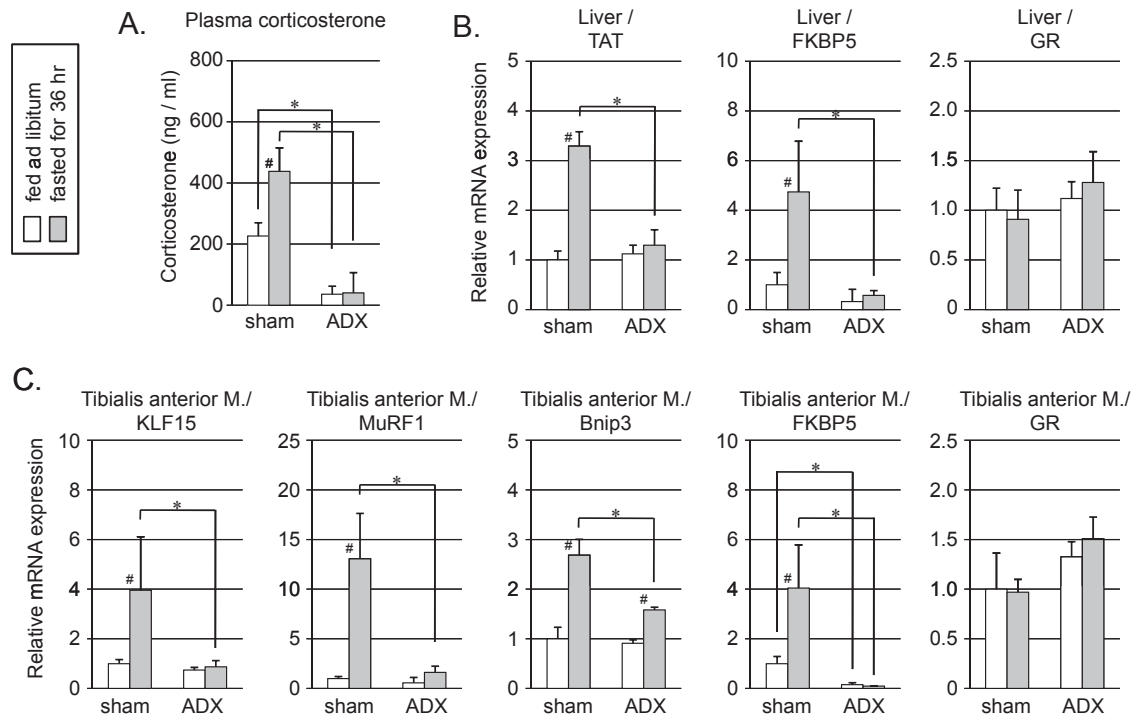
図 1．マウス内在性コルチコステロンの副腎摘除による抑制

Fig.1. Depletion of murine endogenous corticosterone by adrenalectomy.

Either adrenalectomized（ADX）or sham-operated（sham）mice were subjected to fasting for 36 hours（gray boxes）or fed ad libitum（open boxes）.（A）Plasma concentration of endogenous corticosterone（n = 7）. Error bars show standard deviations. *P < 0.001, #P < 0.001 vs. fed mice.（B and C）qRT-PCR analyses of the liver（B）and the tibialis anterior muscle（C）from the mice（n = 5）. Results are shown as fold induction to sham-operated and fed mice. Error bars show standard deviations. *P < 0.01, #P < 0.01 vs. fed mice.
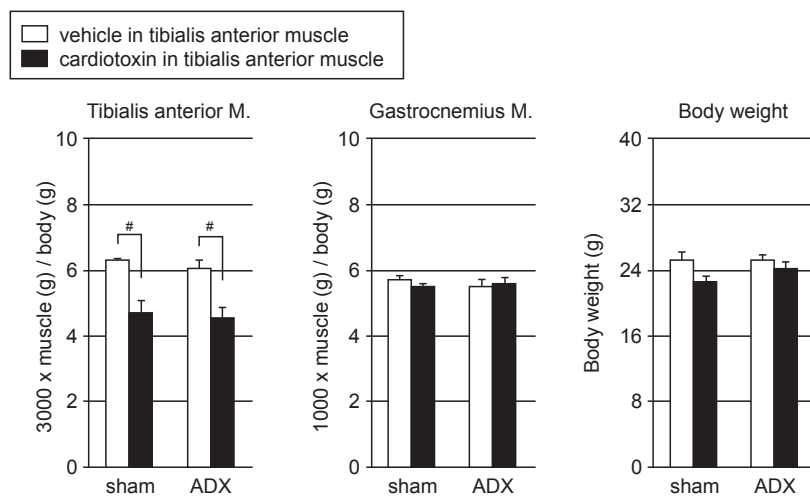
図 2．カルディオトキシンによるマウス前脛骨筋重量の減少

Fig.2. Weight loss of the tibialis anterior muscle by cardiotoxin.

Cardiotoxin（closed boxes）or vehicle（open boxes）were intramuscularly injected into the tibialis anterior muscle of either adrenalectomized（ADX）or sham-operated（sham）mice. The mice were fed ad libitum for 7 days. Weight of the isolated tibialis anterior muscle and the gastrocnemius muscle（uninjected control）were normalized by body weight（n = 14）. Error bars show standard deviations. #P < 0.01.

脛骨筋における GR 標的遺伝子である KLF15、MuRF1、Bnip3および FKBP5[25] の mRNA 発現量を定量 RT-PCR により解析した。これら mRNA の絶食による発現上昇は、肝臓における GR 標的遺伝子と同様に副腎摘除群よりも偽手術群において高かった。（図 1 C）。また、肝臓、前脛骨筋における GR の mRNA 発現量は、副腎摘除、絶食、いずれの処置においても有意な変化を示さなかった（図 1 B, C）。

B．人工的筋損傷による筋湿重量の変化

副腎摘除または偽手術 14 日後、前脛骨筋に体重 20 g のマウス片脚当たり 1 nmol のコブラ由来毒素 CTX または溶媒（生理食塩水）を筋肉注射した。注射 7 日後に前脛骨筋湿重量を測定し、体格補正のため体重で除した。偽手術群、副腎摘除群ともに、CTX によって 25% 程度の前脛骨筋湿重量/体重比の低下（偽手術群 $P = 0.004$, 副腎摘除群 $P < 0.001$）が認められた（図 2 ）。このとき腓腹筋湿重量/体重比（偽手術群 $P = 0.03$, 副腎摘除群 $P = 0.42$）および体重（偽手術群 $P = 0.29$, 副腎摘除群 $P = 0.09$）については、有意な変化を認めなかった（図 2 ）。
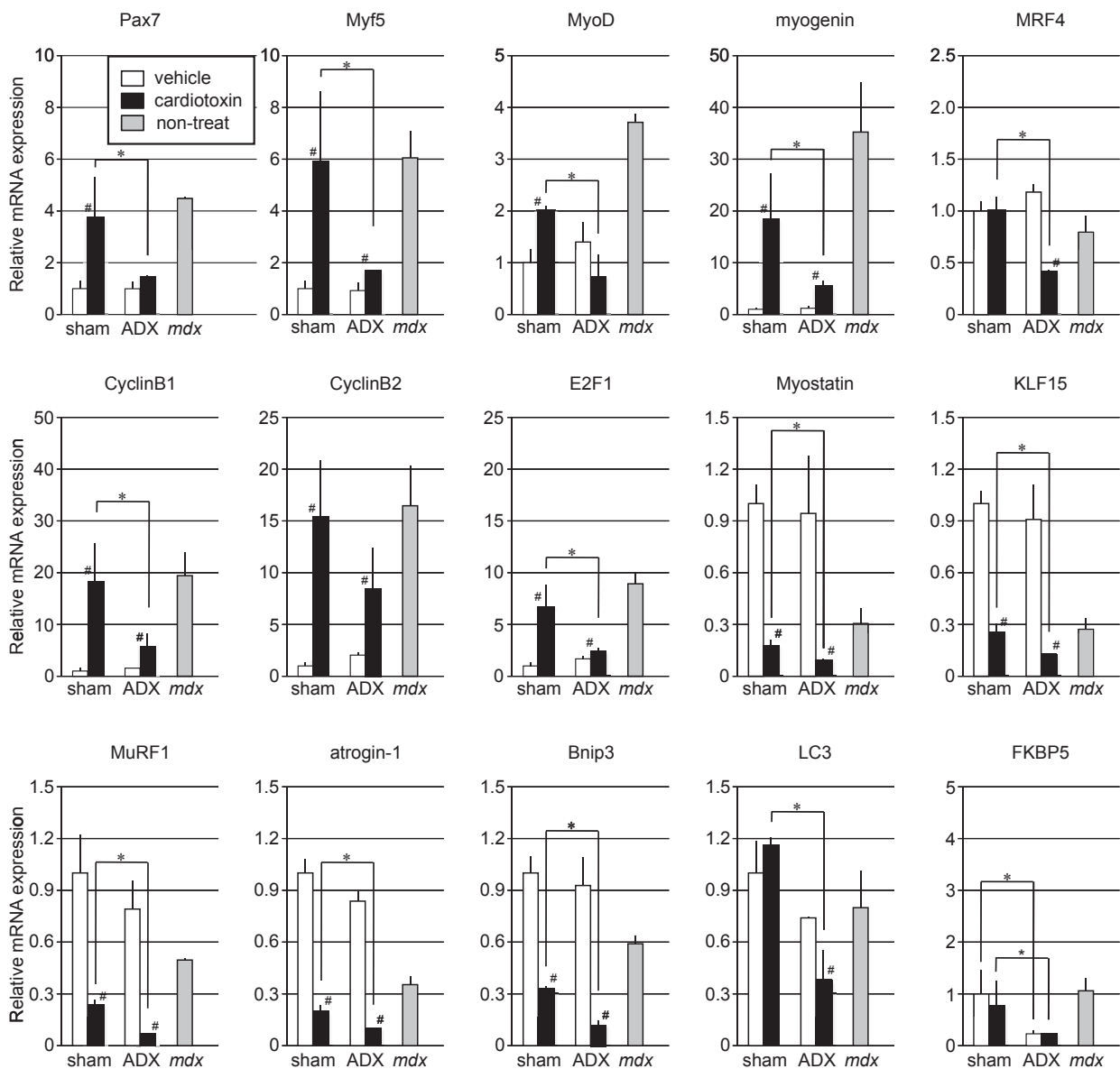
図 3 ．カルディオトキシン筋肉注射によるマウス前脛骨筋 mRNA 発現の変化

Fig.3.　Alteration of mRNA expression pattern in the tibialis anterior muscle by cardiotoxin.

qRT-PCR analysis of the tibialis anterior muscle from the mice described in the legend for Fig.2（n = 7）. Muscle from X-linked muscle dystrophy mice, which shows aggravated degenerative process and accelerated regenerative process simultaneously in the skeletal muscle, was served as a control（mdx）. Results are shown as fold induction to sham-operated and vehicle-treated mice. Error bars show standard deviations. *$P < 0.01$, #$P < 0.01$ vs. vehicle-treated mice.

C．人工的筋損傷による骨格筋 mRNA 発現変化

B で得たマウス前脛骨筋より RNA を抽出し、筋分化の過程で発現が上昇することが知られている遺伝子群（Pax7, Myf 5 , MyoD, myogenin, MRF4）[5]、細胞増殖の活発な状態で発現が上昇することが知られている遺伝子群（CyclinB1, CyclinB2, E2F1）[17,27]、および骨格筋における GR 標的遺伝子群（Myostatin, KLF15, MuRF1, atrogin-1, Bnip3, LC3, FKBP5）[25] の mRNA 発現量を定量 RT-PCR により解析した。筋分化の過程で発現が上昇することが知られている遺伝子群および、細胞増殖の活発な状態で発現が上昇することが知られている遺伝子群のうち、MRF4 を除いた 7 つの遺伝子の mRNA は、偽手術下 CTX 処理によって発現が上昇した（図 3 ）。このときの、これら遺伝子の mRNA 発現量は、筋変性と筋再生の両方が亢進していることが知られている、筋ジストロフィーモデルマウスの一系統、X-linked muscle dystrophy（C57BL/10-mdx）マウス[3] の前脛骨筋における発現量と同等であった（図 3 ）。一方、副腎摘除下では、これら mRNA の CTX 処理による発現上昇は、各遺伝子によって程度の差はあるもののいずれも著明に抑制され、Pax7、MyoD のように、CTX による mRNA 発現上昇が消失する遺伝子もあった（図 3 ）。また、骨格筋における GR 標的遺伝子群のうち、LC3、FKBP5を除いた 5 つの遺伝子 mRNA は、偽手術下 CTX 処理によって発現が低下した（図 3 ）。副腎摘除下の CTX 処理で、これら mRNA 発現が低下するのは同様であったが、LC3、FKBP5を含めたいずれの遺伝子も、偽手術下 CTX 処理群よりも低い発現量に留まった（図 3 ）。

考　　察

最近我々は、GR をカギ因子とした遺伝子転写ネットワークが多様な遺伝子の発現調節を介して、筋線維内蛋白質の異化亢進と同化抑制を誘導し、筋線維の太さを負に制御する分子メカニズムを明らかにした[25]。薬理量のグルココルチコイド投与が、骨格筋を減少させる副作用、すなわちステロイド筋症[19,23] は、このシステムの異常な活性化によって引き起こされると考えられる。しかし一方で、進行性筋ジストロフィーにおける筋量維持に、グルココルチコイド療法は有効であることが知られており[1]、グルココルチコイドが筋量を維持するか減らすかに関して見かけ上相反した知見が得られているといえる。本研究の結果から、活発な筋再生の指標となる、筋衛星細胞の増殖と分化過程において重要な転写因子群（Pax7, Myf 5 , MyoD, myogenin, MRF4）[5] の人工的筋損傷による発現誘導は、副腎摘除による内在性グルココルチコイドの分泌不能によって著しく阻害されることが明らかとなった（図 3 ）。更に、細胞周期における G 2 期から M 期への移行に必要な CyclinB1・B2[17]、また G 1 期から S 期への移行に必要な E2F1 転写因子[27] の人工的筋損傷による発現誘導も、内在性グルココルチコイド分泌に高度に依存していた（図 3 ）。したがって、グルココルチコイドは、筋衛星細胞の増殖と分化の促進を介して筋量を正に制御している可能性が考えられる。実際、ステロイド療法後のデュシェンヌ型筋ジストロフィー患者には、筋衛星細胞が増加していることが明らかとなっている[13]。

ステロイド療法の副作用は、グルココルチコイドの組織特異的作用を介していると考えられている[31]。例えば、肝糖新生の亢進による耐糖能異常[28]、骨芽細胞増殖抑制などによる骨粗鬆症[30]、腎におけるナトリウム排出抑制による高血圧などである[10]。本研究では、骨格筋組織のなかでも筋衛星細胞と筋線維でグルココルチコイドの作用が異なることが示唆された。サルコペニアをはじめとする複雑な要因から発症する「二次的な」筋萎縮のメカニズムを解明し、治療法を構築するためには、骨格筋組織中の細胞種に特異的なグルココルチコイド作用の分子メカニズムの究明が必要であると考えられる。

現在、著者らが中心となって進行させているステロイド筋症患者を対象とした GR 抑制療法の臨床試験と、動物モデルなどを利用した本研究をはじめとする基礎研究から得られた知見とを相互に反映させ発展させることは、多様な要因をもつ「二次的な」筋萎縮に対する有効な治療法を開発する基盤の構築に資すると考えられる。例えば、

筋異化を促進するグルココルチコイドの作用を制限して筋量維持を図る際には、筋衛星細胞を介した筋再生を抑制しない工夫が必要であるという示唆が本研究により得られた。この知見を生かした臨床プロトコールを早急に作成し、その効果を検証することは、筋萎縮によって低下した高齢者のQOL改善と維持に向けた合理的な挑戦になると考えられる。

謝　　辞

本研究の遂行に協力された、丸山崇子研究員(東京大学)、栗原明子技師(東京大学)に深謝する。本研究は文部科学省科研費24116510(新学術領域研究：清水宣明)、日本学術振興会科研費23791050(若手研究(B)：清水宣明)、24390236(基盤研究(B)：田中廣壽)、公益財団法人明治安田厚生事業団(第28回(平成23年度)健康医科学研究助成：清水宣明)の助成を受けて行われたものである。

参 考 文 献

1) Angelini C, Peterle E (2012): Old and new therapeutic developments in steroid treatment in Duchenne muscular dystrophy. Acta Myol, **31** (1), 9-15.

2) Braun T, Gautel M (2011): Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. Nat Rev Mol Cell Biol, **12** (6), 349-361.

3) Bulfield G, Siller WG, Wight PA, Moore KJ (1984): X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. Proc Natl Acad Sci USA, **81** (4), 1189-1192.

4) Calnan DR, Brunet A (2008): The FoxO code. Oncogene, **27** (16), 2276-2288.

5) Chargé SB, Rudnicki MA (2004): Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. Physiol Rev, **84** (1), 209-238.

6) Evans RM (2005): The nuclear receptor superfamily: a rosetta stone for physiology. Mol Endocrinol, **19**, 1429-1438.

7) Glass DJ (2003): Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. Nat Cell Biol, **5**, 87-90.

8) Glass DJ (2010): Signaling pathways perturbing muscle mass. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, **13** (3), 225-229.

9) Goldberg AL, Tischler M, DeMartino G, Griffin G (1980): Hormonal regulation of protein degradation and synthesis in skeletal muscle. Fed Proc, **39** (1), 31-36.

10) Goodwin JE, Geller DS (2012): Glucocorticoid-induced hypertension. Pediatr Nephrol, **27** (7), 1059-1066.

11) Hoffman EP, Nader GA (2004): Balancing muscle hypertrophy and atrophy. Nat Med, **10**, 584-585.

12) Hu Z, Wang H, Lee IH, Du J, Mitch WE (2009): Endogenous glucocorticoids and impaired insulin signaling are both required to stimulate muscle wasting under pathophysiological conditions in mice. J Clin Invest, **119**, 3059-3069.

13) Hussein MR, Abu-Dief EE, Kamel NF, Mostafa MG (2010): Steroid therapy is associated with decreased numbers of dendritic cells and fibroblasts, and increased numbers of satellite cells, in the dystrophic skeletal muscle. J Clin Pathol, **63** (9), 805-813.

14) Jitrapakdee S (2011): Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. Int J Biochem Cell Biol, **44** (1), 33-45.

15) Lecker SH, Solomon V, Mitch WE, Goldberg AL (1999): Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. J Nutr, **129** (1S Suppl), 227S-237S.

16) Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, Burden SJ, Di Lisi R, Sandri C, Zhao J, Goldberg AL, Schiaffino S, Sandri M (2007): FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. Cell Metab, **6**, 458-471.

17) Matsumura I, Tanaka H, Kanakura Y (2003): E2F1 and c-Myc in cell growth and death. Cell Cycle, **2** (4), 333-338.

18) Meijsing SH, Pufall MA, So AY, Bates DL, Chen L, Yamamoto KR (2009): DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity. Science, **324**, 407-410.

19) Menconi M, Fareed M, O'Neal P, Poylin V, Wei W, Hasselgren PO (2007): Role of glucocorticoids in the molecular regulation of muscle wasting. Crit Care Med, **35** (9 Suppl), S602-S608.

20) Narici MV, Maffulli N (2010): Sarcopenia: characteristics, mechanisms and functional significance. Br Med Bull, **95**, 139-159.

21) Sandri M (2008): Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. Physiology, **23**, 160-170.

22) Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL (2004): Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. Cell, **117**, 399-412.

23) Schakman O, Gilson H, Kalista S, Thissen JP (2009): Mechanisms of muscle atrophy induced by glucocorticoids. Horm Res, **72** (Suppl 1), 36-41.

24) Schakman O, Gilson H, Thissen JP (2008): Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy. J Endocrinol, **197** (1), 1-10.

25) Shimizu N, Yoshikawa N, Ito N, Maruyama T, Suzuki Y, Takeda S, Nakae J, Tagata Y, Nishitani S, Takehana K,

Sano M, Fukuda K, Suematsu M, Morimoto C, Tanaka H（2011）: Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle. Cell Metab, **13**（2）, 170-182.

26）Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyva Y, Kline WO, Gonzalez M, Yancopoulos GD, Glass DJ（2004）: The IGF-1/PI3K/ Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. Mol Cell, **14**, 395-403.

27）Vagnarelli P（2012）: Mitotic chromosome condensation in vertebrates. Exp Cell Res, **318**（12）, 1435-1441.

28）van Raalte DH, Ouwens DM, Diamant M（2009）: Novel insights into glucocorticoid-mediated diabetogenic effects: towards expansion of therapeutic options? Eur J Clin Invest, **39**（2）, 81-93.

29）Wang H, Kubica N, Ellisen LW, Jefferson LS, Kimball SR（2006）: Dexamethasone represses signaling through the mammalian target of rapamycin in muscle cells by enhancing expression of REDD1. J Biol Chem, **281**（51）, 39128-39134.

30）Weinstein RS（2011）: Glucocorticoid-induced bone disease. N Engl J Med, **365**（1）, 62-70.

31）Whitehouse MW（2011）: Anti-inflammatory glucocorticoid drugs: reflections after 60 years. Inflammopharmacology, **19**（1）, 1-19.

32）Wullschleger S, Loewith R, Hall MN（2006）: TOR signaling in growth and metabolism. Cell, **124**（3）, 471-484.

33）Yoshikawa N, Nagasaki M, Sano M, Tokudome S, Ueno K, Shimizu N, Imoto S, Miyano S, Suematsu M, Fukuda K, Morimoto C, Tanaka H（2009）: Ligand-based gene expression profiling reveals novel roles of glucocorticoid receptor in cardiac metabolism. Am J Physiol Endocrinol Metab, **296**, E1363-E1373.

34）Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL（2007）: FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. Cell Metab, **6**, 472-483.